پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره)۱۱ شمارهٔ۲، نیمهٔ دوّم ۱۳۹۹
صفحهٔ ۲۲۷-۲۱۵، نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 2, 2019, p. 215-227 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v11i2.84637

تأثیر کلریدکلسیم بر صفات مورفوفیزیولوژیک، بیوشیمیایی و انباشت برخی عناصر در گیاه لوبیاقرمز رقم گلی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش کلریدسدیم

فریناز شمسایی[۱]، علی گنجعلی[۲*] و الهام امجدی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد؛ shamsaie@yahoo.com
۲- دانشیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه و نیز عضو پیوستهٔ گروه پژوهشی بقولات پژوهشکدهٔ علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد؛ elham.amjadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱

چکیده

کلریدسدیم به عنوان یک تنش محیطی، نقش مهم و محدودکننده‌ای بر فرایندهای رشد و نمـوی گیـاه دارد. ایـن پژوهش به منظور بررسی تأثیر کلسیم ($CaCl_2$) در بهبود آسیب‌های ناشی از یون سدیم در گیاه لوبیـاقرمز (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Goli) در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۱ انجام شد. سطوح مختلف کلریدسدیم (شامل ۰، ۵۰،۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) و کلریدکلسیم (شامل ۱۵ و ۱۰، ۵، ۰ میلی-مولار $CaCl_2$) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرارگرفتند. در طول دوره آزمایش گیاهان در فیتوترون با شدت نور تقریبی $600\ \mu mol.m^2.s^{-1}$ و طول دوره روشنایی و تاریکی به‌ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت رشـد نمودند. تنش شدید کلریدسدیم (۱۵۰ میلی‌مولار)، صفات مورفولوژیکی مهم شامل ارتفاع گیاه (۴۹درصـد)، سـطح بـرگ (۵۱ درصد)، وزن خشک ریشه (۶۸ درصد) و بخش هوایی (۳۵ درصد) و مجموع طول ریشه‌ها (۳۵ درصـد) را نسـبت بـه شاهد کاهش داد و صفاتی مانند مقدار سدیم برگ، پرولین و آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز را به‌ترتیب ۳/ ۸، ۰/۷۸ و ۱/۷۵ برابـر نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. کاربرد یون Ca^{2+} به‌ویژه در غلظت ۱۰میلی‌مولار، به مقدار زیـادی آسـیب‌هـای ناشـی از تنش کلریدسدیم را بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه لوبیا کاهش داد. در ایـن ارتبـاط برخـی صـفات ماننـد وزن خشک برگ، ارتفاع گیاه، سطح برگ، شاخص پایداری غشاء، محتوای نسبی آب برگ و میزان کلروفیل کل بـه‌ترتیـب بـه مقدار ۱۷، ۲۵، ۸، ۵، ۴ و ۱۵ درصد در نتیجه کاربرد یون Ca^{2+} نسبت به شرایط عدم کاربرد کلسیم افزایش داشتند.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، شاخص پایداری غشاء، صفات ریشه و اندام هوایی، گیاه لوبیا

مقدمه

حدود ۲۰ درصـد از اراضـی کشاورزی و ۳۳ درصـد از زمین‌های آبیاری‌شده با آب شـور در دنیا بـه درجـات مختلـف تحت تأثیر شـوری قـرار گرفته‌انـد (FAO, 2019). بررسـی‌هـا حاکی از آن اسـت در صـورت اسـتفاده کـافی و مـنظم عناصر غذایی می‌توان مشکلات ناشی از تنش کلریدسدیم را به حداقل ممکن کاهش داد. رشد برخی از گونه‌های گیـاهی هالوفیـت، بـا شرایط خاک شور سازگار می‌باشـد (Shabala, 2013). بـا ایـن حال اکثر گیاهان از جمله گیاهان زراعی به شوری حساس بوده و در طبقه گلیکوفیت‌ها قرار دارند (Köster *et al*., 2019).

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) از نظر سطح زیرکشـت مقام اول را در بین حبوبـات ایـران دارا اسـت و گیـاهی بسـیار حساس به کلریدسدیم می‌باشد. شوری‌هـای بـیش از دو دسـی زیمنس برمتر به این گیاه آسیب وارد می‌نماید (Al hassan *et al*., 2016). لوبیـای رقـم گلـی یکـی از ارقـام لوبیـای قرمـز (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Goli) می‌باشـد کـه مبـدأ آن نیشابور و به رنگ قرمز است. این رقم نسبت به شـرایط اقلیمـی استان خراسان رضوی و خاک‌های شور این منطقه از سـازگاری مناسبی برخوردار است و شاید به همین دلیل است کـه سـطح زیرکشت این رقم نسبت با سایر ارقام لوبیا بالاتر است. لوبیاقرمز به دلیل ایجـاد پوشـش سـریع و تشـکیل کـانوپی گسـترده، در رقابت با علف‌های‌هرز معمولاً موفق بوده و از عملکرد دانه نسبتاً مناسبی نیز برخوردار است (Dorri, 2008).

در محیط‌های دارای تـنش کلریدسـدیم، رشـد و عملکـرد گیاهان به مقدار زیـادی کـاهش مـی‌یابـد کـه علـت اصـلی آن اختلال در عملکرد اجزای حیاتی فتوسنتز، مثل آنزیم روبیسـکو می‌باشد که منجر به کاهش ظرفیت فتوسنتزی گیـاه مـی‌شـود. یکی از اثرات اولیـه کلریدسـدیم کـاهش مقـدار آب بافت‌هـای

*نویسنده مسئول: ganjeali@um.ac.ir

گیاهی است که سبب کاهش پتانسیل اسمزی در ناحیه توسعه ریشه می‌شود (Hu *et al*., 2013). افزایش پرولین به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی تحت تنش کلریدسدیم سبب کاهش فشار اسمز درون سلول و جذب آب به درون سلول می‌شود (Dahal *et al*., 2019). در محیط های دارای تنش، پرولین با پروتون (H^+) ترکیب و سبب کاهش اکسیداسیون و مانع تجزیه ماکرومولکول‌های حیاتی مانند آنزیم‌های سیتوسولی و اندامک های سلولی می‌شود (Haghighi *et al*., 2012). در این ارتباط پرولین نقش مهمی‌در حفاظت از ساختمان سلول و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایفا می‌نماید (Dahal *et al*., 2019).

کلریدسدیم از طریق القای تنش اکسیداتیو در گیاه، تولید گونه‌های فعال اکسیژن را سبب می‌شود و نتیجه این عمل تخریب غشاها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک است (Rahman *et al*., 2016). غلظت بحرانی سدیم سیتوسولی کمتر از ۱mM می‌باشد. انتقال سدیم سیتوسولی و ذخیره آن در واکوئل‌ها، راهکاری برای ممانعت از سمیت سدیم می‌باشد. انباشت سدیم در واکوئل سبب حفاظت از آنزیم‌های سیتوسولی در برابر اثرات سمی سدیم، حفظ تعادل اسمزی واکوئل، سیتوزول و نیز ساخت اسمولیت‌های سازگار می‌باشد که نتیجه مهم آن انتقال هر چه بیشتر آب به سلول و کاهش اثرات منفی سمیت یونی است (Acosta-Motosa *et al*., 2015).

کلسیم به عنوان یکی از عناصر مغذی ضروری سبب حفظ یکپارچگی غشاء و دیواره سلولی، حفظ همئوستاز یون و تنظیم مسیر SOS[1] به منظور همئوستاز یونی می‌شود (Hadi & Karimi, 2012). تثبیت ساختار دیواره سلولی، کنترل رفتار تبادل یون و همچنین فعالیت آنزیم‌ها در دیواره سلولی از دیگر وظایف کلسیم می‌باشد (Thor, 2019). در حقیقت، کلسیم عملکردهای حیاتی فیزیولوژیکی در گیاهان نظیر ساماندهی دیواره‌های سلولی توسط پکتات کلسیم، تثبیت غشاها، جوانه زنی گرده، رشد لوله‌گرده و ریشه‌ها را انجام می‌دهد (Silva Domingues1 *et al*., 2016). استفاده از ترکیباتی مانندگچ ($CaSO_4{\cdot}2H_2O$)، کلسیم کلرید ($CaCl_2$) و کلسیت ($CaCO_3$) سبب بهبود رشد گیاه شده است (Niamat *et al*., 2019). بررسی‌های انجام‌شده در خصوص برخی از حبوبات حاکی از ان بود که افزایش غلظت کلسیم موجود در بستر رشد گیاه، مانع اثرات منفی سدیم شد. در این مطالعات، بیوماس بخش هوایی و ریشه و همچنین تجمع کلسیم در ریشه و ساقه افزایش یافت (Silva Domingues1 *et al*., 2016). به منظور ورود سدیم و کلسیم به سلول از طریق غشای سلولی، رقابت بین سدیم و کلسیم وجود دارد که افزایش غلظت کلسیم سبب کاهش نفوذپذیری غشای پلاسمایی به سدیم و تغییر ویژگی های دیواره سلولی می‌شود که نتیجه آن کاهش انتقال یون سدیم به روش انتقال غیرفعال و کاهش انباشت آن در سلول است. بررسی‌ها مؤید این است که در حضور کلسیم، میزان پتاسیم جذب‌شده در گیاه افزایش می‌یابد (Javanshah & Nasab, 2016). شناخت اثرات متقابل یون‌های Na^+/Ca^{2+} بر رفتار مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه و نیز بررسی اثرات بهبوددهنده Ca^{2+} بر سمیت ناشی از زیادی یون Na^+ درگیاه لوبیای قرمز از اهداف اصلی این آزمایش است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف کلریدسدیم شامل ۰، ۵۰،۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl و سطوح مختلف کلسیم شامل ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار $CaCl_2$ بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه لوبیاقرمز رقم گلی (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Goli)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۱ انجام شد. بذور لوبیا پس از شستشو و ضدعفونی به مدت ۲۴ساعت در آب خیسانده و سپس در گلدان‌های پلاستیکی به حجم دو لیتر حاوی خاک حاصلخیز که به نسبت ۱:۳ از خاک مزرعه و ماسه نرم پر شده بودند، کشت شدند. گلدان‌ها به فیتوترون با شدت نور حدود 600 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ و طول دوره روشنایی ۱۶ساعت و دمای ۲۵^{o}C و همچنین دوره تاریکی هشت ساعت و دمای ۱۷^{o}C منتقل شدند. گلدان‌ها به مدت دو هفته تا سبزشدن با آب معمولی آبیاری و پس از آن آبیاری مطابق تیمارهای آزمایشی (غلظت‌های مشخص‌شده از کلریدسدیم و کلسیم) تا زمان برداشت مورد تیمار قرار گرفتند. به‌منظور ثابت‌نگه‌داشتن مقدار کلریدسدیم و پرهیز از تجمع نمک در گلدان‌ها، هدایت الکتریکی زه‌آب گلدان‌ها مرتباً اندازه‌گیری و در صورت نیاز از آب مقطر برای شستشوی نمک اضافی گلدان‌ها استفاده شد. هفته چهارم بعد از سبزشدن گیاهان از گلدان‌ها خارج و سپس بخش هوایی و ریشه هر گیاه تفکیک شدند. صفات مورفولوژیکی شامل ارتفاع گیاه به وسیله خط‌کش و سطح برگ‌ها به وسیله دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (ساخت شرکتADC انگلستان مدل Light BOX) سنجش شدند. صفات مربوط به ریشه مانند طول و قطر ریشه پس از رنگ آمیزی با پرمنگنات منیزیم و خارج‌کردن آب سطح ریشه، به

۱. Salt Overly Sensitive

وسیله یک اسکنر متصل به کامپیوتر (ساخت شرکت Delta-T) اندازه‌گیری و ثبت شدند. برای تعیین وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ها، نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند و سپس وزن خشک آن‌ها با ترازوی (sartorius مدل BL 150 S) با دقت ۰/۰۰۱ ± گرم تعیین شد.

سنجش کلروفیل

استخراج کلروفیل از برگ با کمک استن ۸۰درصد انجام شد. برای این منظور ۰/۲ گرم برگ تازه با مقدار کمی‌استن ساییده و در هر مرحله، محلول شفاف رویی به بالون ژوژه ۲۵ml منتقل شد. عمل استخراج تا حصول یک محلول بی‌رنگ ادامه یافت. سپس حجم محلول با استن به ۲۵ml رسید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب نوری در طول موج‌های ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل-Shimadzu UV-120-02 تعیین گردید. مقدار کلروفیل کل برحسب میلی‌گرم کلروفیل در گرم برگ مطابق فرمول (۱) با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد (Arnon, 1956; Makinney, 1941):

(۱)

کلروفیل کل $(mg\ g^{-1}\ FW) = (20A_{646}+8.02A_{663})V/W\times1000$

V= حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)

A= جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر

W= وزن تر نمونه بر حسب گرم

شاخص پایداری غشاء

۰/۱ گرم از برگ دوم در دو سری لوله آزمایش حاوی ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد. یک سری از لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۰ درجه و سری دیگر لوله‌ها در بن‌ماری ۱۰۰درجه به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شد. سپس از بن‌ماری خارج شد و به دمای محیط رسانده شد و هدایت الکتریکی نمونه‌ها توسط ECمتر (مدل Jenway) سنجش گردید و سپس شاخص پایداری غشاء برحسب درصد با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد (Sairam *et al*., 2001).

(۲)

$$MSI\ (\%) = [1-(C1/C2)]\times100$$

C1 هدایت الکتریکی آب در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و C2 هدایت الکتریکی آب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد می باشد.

محتوای نسبی آب برگ

به منظور تعیین محتوای نسبی آب، قبل از برداشت گیاه مقدار وزن‌شده‌ای از برگ دوم هر گیاه به مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر غوطه‌ور شد، سپس برگ‌ها از آب خارج و آب سطحی آن‌ها توسط دستمال خشک شد و پس از این مرحله برگ‌ها وزن شدند. به منظور تعیین وزن خشک برگ‌ها از آون ۷۰درجه به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. محتوای نسبی آب برگ[۱] بر حسب درصد با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد (Bian & Jiang, 2009):

(۳)

$$RWC\ (\%) = (FW-DW/TW-DW)\times100$$

Fw وزن تر برگ، DW وزن خشک برگ و TW وزن برگ در حالت آماس کامل می‌باشد.

سنجش پرولین

سنجش پرولین برگ بر حسب میکروگرم در گرم وزن‌تر با استفاده از معادله ۴ انجام شد. در این روش مقدار جذب محلول در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل شیمادوز (UV-1100) خوانده و غلظت پرولین موجود در نمونه از منحنی استاندارد تعیین شد و سپس براساس وزن تر نمونه از فرمول زیر محاسبه شد (Bates *et al*., 1973).

(۴)

$$Prolin\ (\mu mol\ g\text{-}1\ FW) = \left[\frac{\mu g prolin}{ml}\times\frac{Toloen(ml)}{115.5(\mu g/mol)}\right]\div\frac{sample(g)}{5}$$

سنجش سدیم، پتاسیم و کلسیم

سنجش عناصر سدیم، پتاسیم و کلسیم با استفاده از روش Chapman & Pratt (1961) انجام شد. به این منظور، جذب محلول‌های حاصله توسط فلیم‌فتومتر (JENWAY PFP 7) خوانده شد. غلظت کاتیون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم به روش نورسنجی شعله‌ای و توسط دستگاه نورسنج شعله‌ای مدل Corning تعیین گردید. غلظت نهایی هر کاتیون با استفاده از منحنی استاندارد به طور جداگانه تعیین و مقدار آن بر حسب وزن خشک برگ و ریشه محاسبه شد

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با استفاده از روش Raymond *et al*, (1993) انجام شد. به این ترتیب که در ابتدا به تعداد نمونه‌ها لوله‌ها را در حمام آب ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به‌ترتیب به هر لوله ۲/۵میلی‌لیتر محلول بافرفسفات ۰/۲ مولار با pH =۶/۸ و ۰/۲میلی‌لیتر پیروگالل ۰/۰۲مولار اضافه گردید و به آن‌ها فرصت داده شد تا به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد برسند. در لحظه خوانش جذب آنزیم به هر لوله ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی‌اضافه کرده و

۱. RWC

تغییرات جذب پلی‌فنل‌اکسیداز به مدت چهار دقیقه هر ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۳۰ نانومتر ثبت شد.

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارMstat-C انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ($P\leq ۰/۰۵$) استفاده شد. نمودارهای مربوطه به وسیله نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

بررسی صفات مورفولوژیکی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش کلریدسدیم تأثیر معنی‌داری بر کلیه صفات مورفولوژیکی گیاه داشت. صفاتی مانند وزن خشک ریشه، مجموع طول ریشه و سطح برگ در گیاه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم قرار نگرفتند. تأثیر برهمکنش Na^{+} و Ca^{2+} به‌جُز وزن خشک و قطر ریشه در گیاه بر تمامی‌صفات مورفولوژیکی مورد بررسی در این آزمایش معنی‌دار بود (جدول ۱). غلظت‌های بالای Na^{+} علاوه بر ایجاد سمیت، از طریق کاهش پتانسل اسمزی خاک می‌تواند سبب تنش ثانویه خشکی شود. یکی از علایم بارز تنش خشکی، کاهش آماس سلولی است. کاهش پتانسیل فشار منجر به کاهش رشد سلولی می‌گردد که برای انجام تقسیم سلولی و بزرگ‌شدن سلول‌ها در بافت‌های مختلف گیاه لازم است. حفظ سدیم و ممانعت از انتقال آن به بخش هوایی یکی از روش‌های بهبود تحمل به کلریدسدیم در بعضی از گیاهان می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت سدیم سطح کربوهیدرات و میزان هورمون‌های رشد کاهش می‌یابد که منجر به کاهش رشد در ریشه و برگ می‌گردد (Silva Domingues1 *et al*., 2016).

در محیط فاقد تنش کلریدسدیم، کاربرد یون Ca^{2+} به‌جُز در غلظت ۱۵میلی‌مولار، تأثیر معنی‌داری بر کاهش وزن خشک ساقه گیاه نداشت. در کلریدسدیم ۵۰ میلی‌مولار، کاربرد غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار یون Ca^{2+} گرچه وزن خشک ساقه را نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد کلسیم) به‌ترتیب ۱۴/۵ و ۹/۱ درصد افزایش داد، اما این افزایش معنی‌دار نبود. در تنش شدید کلریدسدیم (۱۵۰ میلی‌مولار NaCl)، کاربرد ۱۰میلی‌مولار $CaCl_2$، وزن خشک بخش هوایی گیاه را نسبت به شاهد (بدون کلسیم) به میزان ۶۵ درصد افزایش داد که یک افزایش بسیار معنی‌داری بود (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین وزن خشک ریشه نشان داد که با افزایش شدت تنش، از تیمار شاهد تا سطح ۱۵۰میلی‌مولار کلریدسدیم، وزن خشک ریشه به صورت معنی داری در تمامی سطوح کاربرد یون Ca^{2+} کاهش یافت. در این آزمایش کاربرد کلسیم در هیچ سطحی از تنش شوری بهبوددهنده رشد ریشه نبود. بیشترین وزن خشک ریشه (۰/۰۶۳ g) به کاربرد ۵میلی-مولار Ca^{2+} در محیط فاقد کلریدسدیم اختصاص داشت (جدول ۲).

جدول ۱- میانگین مربعات صفات مورفولوژیک لوبیاقرمز

Table 1. Sum of square for morphological traits of *Phaseolus vulgaris* L.

منابع تغییرات **Source of variance**	درجه آزادی **df**	وزن خشک ساقه **Shoot dry weight**	وزن خشک ریشه **Root dry weight**	ارتفاع گیاه **Plant height**	مجموع طول ریشه‌ها **Total root length**	شاخص سطح برگ گیاه **Leaf area**	قطرریشه **Root diameter**
کلریدسدیم NaCl	3	** 0.006411	** 0.003705	** 105.884	** 6264221	** 2620292.03	** 0.023
کلسیم $CaCl_2$	3	** 0.002684	ns 0.000026	** 34.435	ns 308075	ns 15855.94	** 0.007
کلریدسدیم و کلسیم NaCl× $CaCl_2$	9	** 0.000642	ns 0.000027	* 3.152	* 466893	** 92532.09	ns 0.001
Error خطا	32	0.000143	0.000028	1.3	161420	23450.63	0.001

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

*, **and ns: Significant difference in 0.05, 0.01 and non significant respectively

جدول۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک لوبیاقرمز

Table 2. Mean comparisons for morphological traits of *Phaseolus vulgaris* L.

سطوح کلریدسدیم NaCl (mM)	سطوح کلسیم $CaCl_2$(mM)	وزن خشک ساقه Shoot dry weight (g)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	مجموع طول ریشه‌ها Total root length (mm)	سطح برگ گیاه Leaf area (mm^2)	قطرریشه Root diameter (mm)
0	0	0.160 a	0.054 bc	14.88 b-d	4153 bc	4537 a	0.331 a-b
	5	0.152 ab	0.063 a	17.87 a	5315 a	4014 b	0.357 ab
	10	0.142 ab	0.058 ab	16.77 ab	4197 bc	3955 bc	0.365 a
	15	0.129 b	0.053 bc	13.61 de	4330 b	3489 d	0.283 b-f
50	0	0.131 ab	0.049 cd	12.72 de	4103 bc	3213 de	0.314 a-e
	5	0.150 ab	0.056 a-c	16.00 a-c	4580 b	3447 d	0.331 a-d
	10	0.143 ab	0.051 bc	14.67 b-d	4179 bc	3518 cd	0.350 ab
	15	0.128 b	0.051 bc	14.53 cd	4298 bc	3669 b-d	0.332 a-d
100	0	0.123 b	0.039 e	9.92 fg	3253 de	2826 ef	0.260 c-f
	5	0.129 b	0.041 e	12.32 e	3540 cd	27.2 fg	0.336 a-c
	10	0.151 ab	0.042 de	13.67 de	4079 bc	3517 cd	0.314 a-e
	15	0.087 c	0.038 e	8.66 gh	3140 de	2485 fg	0.244 fe
150	0	0.077 c	0.021 f	8.12 gh	3113 de	1798 h	0.226 f
	5	0.092 c	0.016 f	10 fg	2636 e	1813 h	0.255 df
	10	0.127 b	0.018 f	11.83 ef	2900 de	2368 g	0.249 ef
	15	0.078 c	0.020 f	7.33 h	3088 de	1867 h	0.234 f

در هرستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای درصد می‌باشند.

In each column, means with common letter(s) do not have a significant difference at the P<0.05.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها در خصوص ارتفاع گیاه نشان داد که بیشترین ارتفاع گیاه به تیمار ۵ میلی‌مولار $CaCl_2$ و تیمار شاهد (سطح صفر میلی‌مولار NaCl) مربوط بود (۱۷/۸۷ cm). تقریباً در تمامی‌سطوح کلریدسدیم، کاربرد مقادیر ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلسیم نسبت به عدم کاربرد آن (شاهد کلسیم) ارتفاع گیاه را به صورت معنی‌داری بهبود بخشید. در این آزمایش نقش بهبوددهندگی کلسیم در افزایش ارتفاع گیاه با افزایش شدت کلریدسدیم بتدریج کاهش یافت (جدول ۲).

مشابه نتایج وزن خشک ریشه، بیشترین مجموع طول ریشه‌ها (۵۳۱۵ mm)، به کاربرد ۵ میلی‌گرم یون Ca^{2+} در محیط فاقد تنش کلریدسدیم مربوط بود. با افزایش شدت تنش کلریدسدیم، مجموع طول ریشه‌ها به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. کاربرد ۱۰ میلی‌مولار یون Ca^{2+} تنها در تیمار کلریدسدیم ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl توانست نقش بهبوددهندگی (افزایش ۲۵/۳ درصدی) برای کاهش اثرات منفی ناشی از تنش شوری داشته باشد. کمترین مجموع طول ریشه (۳۱۱۳mm) به تیمار تنش کلرید سدیم شدید (۱۵۰میلی‌مولار NaCl) و عدم کاربرد یون Ca^{2+} اختصاص داشت.

نتایج مقایسه میانگین سطح برگ در گیاه حاکی از کاهش شدید آن با افزایش تنش کلریدسدیم است. در این آزمایش بیشترین سطح برگ (۴۵۳۷ mm^2) و کمترین آن (۱۷۹۸ mm^2) در گیاه به‌ترتیب به تیمار شاهد (عدم حضور یون‌های Ca^{2+} و Na^+) و تنش شدید کلریدسدیم (۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) و عدم کاربرد یون Ca^{2+} مربوط بود. در شدت‌های بالای تنش کلریدسدیم (۱۰۰ و ۱۵۰میلی‌مولار NaCl)، کاربرد ۱۰میلی‌مولار یون Ca^{2+} اثرات منفی ناشی از تنش کلریدسدیم را بهبود بخشید که نتیجه آن افزایش معنی‌دار سطح برگ گیاه (به‌ترتیب افزایش ۲۰/۷۶ و ۳۱/۷ درصدی) نسبت به تیمار شاهد (بدون کلسیم) در همین سطح کلریدسدیم است (جدول ۲).

هماهنگ با سایر نتایج مربوط به صفات ریشه، قطر ریشه نیز با افزایش شدت تنش کلریدسدیم به صورت معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین و کمترین قطر ریشه به‌ترتیب به تیمار ۱۰ میلی‌مولار یون Ca^{2+} در محیط بدون تنش کلرید سدیم (۳۶۵ mm) و تیمار عدم یون Ca^{2+} در شرایط تنش شدید کلرید سدیم (۱۵۰ میلی‌مولار) (۰/۲۲۶ mm) مربوط بود.

یون Ca^{2+} عمدتاً در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، اثرات منفی ناشی از تنش کلریدسدیم بر اغلب صفات مورفولوژیک گیاهان را تعدیل نمود. افزایش سطح Ca^{2+} در محیط دارای یون‌های Na^+، احتمالاً اتصال یون Na^+ به دیواره‌های سلولی و غشای پلاسمایی را مهار و از این رو باعث کاهش نشت الکترولیت‌ها از غشاء شده است. همچنین یون Ca^{2+} جذب و انتقال یون K^+ را افزایش و متعاقب آن انباشت یون Na^+ را کاهش داده است. اثرات بهبوددهندگی کاربرد یون Ca^{2+} تحت شرایط تنش کلرید سدیم نه‌تنها به بهبود عملکرد غشاها، بلکه به ایجاد شرایط مناسب برای طویل‌شدن و تقسیم سلولی

بیشتر، نسبت داده می‌شود. کلسیم از طریق مشارکت در ساخت دیواره سلولی، امکان سنتز و ترمیم دیواره‌های سلولی را با عملکرد کارآمدتر بهبود می‌بخشد (Farooq *et al*., 2010).

انباشت سدیم در محیط فعالیت ریشه علاوه بر ایجاد سمیت یونی، تنش ثانویه خشکی را نیز به دنبال دارد که نتیجه آن بسته‌شدن روزنه، کاهش میزان سنتز کلروفیل و نهایتاً کاهش فتوسنتز و تولید زیست‌توده گیاه می‌باشد. در این راستا بررسی‌ها حاکی از آن است که حضور یون‌های Ca^{2+} از طریق افزایش حضور ABA در سلول‌های همراه و متعاقب آن مدیریت کارآمدتر روزنه، تا حد زیادی اثرات سوء یون‌های Na^{+} را بر فتوسنتز رفع می‌نماید. حضور یون‌های Ca^{2+} معمولاً کاهش نسبت سدیم به کلسیم را در فضای سلولی به دنبال دارد که نتیجه آن بهبود عملکرد دیواره‌ها و غشاهای سلولی از حیث ترابری مواد محلول به محل‌های متابولیسم می‌باشد. بدیهی است در این شرایط بیوسنتز ترکیبات آلی افزایش یافته که منجر به افزایش وزن بخش‌های مختلف گیاه می‌گردد (Farooq *et al*., 2010).

بررسی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که تنش کلریدسدیم، کلسیم و اثر متقابل یون‌های Ca^{2+} و Na^{+} تأثیر معنی‌داری بر کلیه صفات مورد بررسی داشت (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که با افزایش تنش کلریدسدیم شاخص پایداری غشاء کاهش یافت. در این ارتباط کاربرد ۱۰ میلی‌مولار یون Ca^{2+} در سطوح کلریدسدیم کم و متوسط نقش تعدیل‌کننده داشت و اثرات منفی یون‌های Na^{+} را در کاهش پایداری غشاء نسبت به تیمار شاهد (بدون حضور یون Ca^{2+}) بهبود بخشید. در سطوح بالای کلریدسدیم (۱۵۰میلی‌مولار)، کاربرد غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار یون Ca^{2+} نه‌تنها تعدیل‌کننده نبود، بلکه شاخص پایدری غشاء را به‌صورت معنی‌داری (به‌ترتیب ۲۵/۱ و ۲۱/۶۷ درصد) کاهش داد (جدول ۴). افزایش حضور یون‌های Na^{+} احتمالاً یکپارچگی غشاء را تحت تأثیر قرار داده و نفوذپذیری غشاء را کاهش داده است که نتیجه آن سرکوب جذب، انتقال و همچنین عدم توازن و توزیع عناصر غذایی به ویژه کلسیم به علت حضور سدیم مازاد در بخش‌های مختلف گیاه خواهد بود (Javanshah & Nasab, 2016).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که برهمکنش Na^{+} و Ca^{2+} تأثیر معنی‌داری بر محتوای نسبی آب برگ گیاه داشت (جدول ۴). تقریباً در تمامی سطوح کلریدسدیم، غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار Ca^{2+} موجب افزایش محتوای نسبی آب برگ گیاه نسبت به شاهد (بدون کاربرد Ca^{2+}) شد. کاربرد ۱۵ میلی‌مولار Ca^{2+} در تمامی سطوح کلریدسدیم منجر به کاهش محتوای نسبی آب برگ شد (جدول ۴). اعتقاد اغلب محققان بر این است که یون‌های Na^{+} و Ca^{2+} باعث تغییر در ترکیب لیپیدهای غشائی می‌شوند. در یک آزمایش روی گیاهان لوبیا و جو، کلریدسدیم باعث کاهش محتوای لیپیدهای کل غشاء و به دنبال آن کاهش تراکم بار سطحی غشا شد. در این شرایط کاربرد یون‌های Ca^{2+} محتوای فسفولیپیدی را در هر دو گیاه افزایش داد. در این آزمایش افزایش مقدار اسیدهای چرب غیراشباع، نفوذپذیری بیشتر غشاء را به یون پتاسیم و متعاقب آن، تنظیم بهتر اسمزی برای جذب و انتقال بیشتر آب توسط ریشه به مناطق هدف را فراهم نمود (Summart *et al*., 2010). در یک آزمایش محققان بیان داشتند که نسبت Na^{+}/Ca^{2+} به مقدار زیادی بر انتقال و جابجایی آب در ریشه و برگ‌ها تأثیرگذار است. افزایش یون Ca^{2+} به محیط کشت مایع، هدایت هیدرولیکی و به دنبال آن روابط آبی گیاه را به صورت معنی داری افزایش داد. بهبود پایداری و جذب انتخابی کارآمدتر غشاء از دیگر ویژگی‌هایی بود که تحت تأثیر کاربرد یون Ca^{2+} قرار گرفت (Hadi & Karimi, 2012).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش تنش کلریدسدیم، محتوای کلروفیل‌کل برگ به صورت معنی‌داری کاهش یافت. کمترین میزان کلروفیل‌کل (mg/g leaf fw ۱/۴۳) به کاربرد ۱۵میلی‌مولار یون Ca^{2+} و کلریدسدیم ۱۵۰میلی‌مولار NaCl مربوط بود (جدول ۴). احتمالاً تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در کلروپلاست‌های گیاهان مواجه با تنش کلریدسدیم، از جمله دلایل اصلی پراکسیداسیون لیپیدها در غشای کلروپلاست و متعاقب آن کاهش سنتز کلروفیل خواهد بود. از طرف دیگر ایجاد سمیت یونی به دلیل وجود غلظت‌های بالای یون Na^{+}، فعالیت بیشتر آنزیم کلروفیلاز و به دنبال آن تجزیه بیشتر مولکول کلروفیل را به دنبال دارد. در این ارتباط افزایش غلظت بعضی از مواد تنظیم‌کننده رشد نظیر ABA، اتیلن و اکسین در شرایط تنش، سبب تحریک بیشتر فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تجزیه بیشتر کلروفیل می‌شود (Amirul Alam *et al*., 2015).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک لوبیاقرمز

Table 3. Analyze of variance for physiological traits of *Phaseolus vulgaris* L.

منابع تغییرات **Source of varation**	درجه آزادی **df**	شاخص پایداری غشاء **Membrane stability (%)**	محتوای نسبی آب برگ **Relative water content (%)**	شاخص کلروفیل **chlorophyll index**	پرولین **Prolin (μ mol g^{-1})**	آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز **Polyphenol oxidase (A_{430} min^{-1}. g FW)**
کلریدسدیم NaCl	3	** 7723.862	** 596.632	** 5.48	** 58.207	** 0.000488
کلسیم $CaCl_2$	3	** 95.837	** 135.254	** 1.05	** 15.900	** 0.000109
کلریدسدیم و کلسیم NaCl× $CaCl_2$	9	** 11.216	** 22.93	* 0.33	** 1.619	** 0.000008
Error خطا	32	2.256	4.120	0.123	0.104	0.000002

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

*, **and ns: Significant difference in 0.05, 0.01 and non significant respectively

جدول۴- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیک لوبیا

Table 4. Mean comparisons of physiological traits of *Phaseolus vulgaris* L.

سطوح کلرید سدیم **NaCl (mM)**	سطوح کلسیم **$CaCl_2$ (mM)**	شاخص پایداری غشاء **Membrane stability index (%)**	محتوای نسبی آب برگ **Relative water content (%)**	کلروفیل کل **Total hlorophyll (mg/g leaf fw)**	پرولین **Prolin (μ mol g^{-1})**	آنزیم پلی فنول اکسیداز **Polyphenol oxidase (A_{430} min^{-1}. g FW)**
0	0	85.53 bc	81.02 a	3.55 a-d	0.94 j	0.0083 hi
	5	86.93 ab	80.67 a	3.70 a-c	0.88 j	0.0067 i
	10	88.97 a	76.70 bc	3.83 ab	0.90 j	0.0071 i
	15	83.67 c	77.02 a-c	3.46 a-e	3.13 g	0.011 fg
50	0	54.97 de	74.56 b-d	3.19 b-f	3.44 fg	0.013 ef
	5	56.8 de	78.28 ab	3.94 a	1.70 i	0.0086hi
	10	60.10 d	77.04 a-c	3.95 a	2.80 gh	0.0090 ghi
	15	53.03 e	71.36 de	3.70 a-c	3.51 e-g	0.012 egf
100	0	43.03 g	66.77 e-g	2.84 ef	4.24 de	0.020 cd
	5	49.02 f	72.81 cd	3.2 b-f	2.23 hi	0.014 e
	10	47.60 f	76 b-d	2.95 d-f	2.73 gh	0.013ef
	15	39.30 h	63 gh	3.06 c-f	4.57 d	0.023 bc
150	0	27.60 i	61.17 hi	1.95 gh	7.59 b	0.024 ab
	5	28.30 i	68 ef	3.07 c-f	4.00 d-f	0.018 d
	10	25.10 i	64 f-h	2.53 fg	6.66 c	0.020 cd
	15	21.67 j	57.67 j	1.43 h	8.42 a	0.026 a

در هرستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای درصد می‌باشند.

In each column, means with common letter(s) do not have a significant difference at the P<0.05.

در اغلب سطوح کلریدسدیم، کاربرد یون Ca^{2+} اثرات منفی ناشی از سمیت یونی Na^{+} را برکلروفیل کل به مقدار زیادی نسبت به شاهد کاهش داد. در تیمار کلریدسدیم ۱۵۰میلی مولار، کاربرد ۵ و ۱۰ میلی‌مولار یونCa^{2+} مقدار کلروفیل کل را به‌ترتیب به مقدار ۵۷/۴۳ و ۲۹/۷ درصد افزایش داد. افزایش مقدار کلروفیل کل، تنها در غلظت ۵ میلی‌مولار $CaCl_2$ معنی-دار بود (جدول ۴). افزایش Ca^{2+} خارجی با مسدودکردن کانال‌های یونی، سبب کاهش غلظت Na^{+} داخلی شده و احتمالاً از این طریق اثر مهاری سدیم بر رشد گیاه را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد کلسیم از طریق جلوگیری از فعالیت آنزیم گلوتامات لیگاز، از تبدیل گلوتامین به پرولین ممانعت نموده، بنابراین گلوتامین در جهت سنتز کلروفیل مصرف شده است (Neeta Patil, 2012).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که تنش کلریدسدیم و برهمکنش آن با یون Ca^{2+} تأثیر معنی‌داری بر مقدار پرولین گیاه لوبیا داشت (جدول ۳). با افزایش سطح کلریدسدیم میزان پرولین به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۴). پرولین به تنظیم اسمز در طول تنش، حفظ ساختمان اولیه ماکروملکول‌ها و غشاها در جریان افزایش دهیدراسیون، لاشخواری رادیکال آزاد و حفاظت از آنزیم‌ها کمک می‌کند (Dahal *et al*., 2019). انباشت پرولین تحت تنش شوری ممکن است به علت فعال‌سازی آنزیم‌های بیوسنتزی پرولین، کاهش اکسیداسیون و تبدیل آن به گلوتامات، کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین‌ها و افزایش واژگردی پروتئین‌ها باشد (Amira & Abdul Qados, 2011). در کلیه سطوح کلریدسدیم، کاربرد ۵ و ۱۰ میلی‌مولار

$CaCl_2$، میزان پرولین برگ را به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد (بدون کاربرد $CaCl_2$) کاهش داد. این کاهش در تیمار کاربرد ۵ میلی‌مولار یون Ca^{2+} عموماً بیشتر از ۱۰ میلی‌مولار یون Ca^{2+} بود (جدول ۴). بررسی‌ها حاکی از آن است که افزایش غلظت کلسیم در محیط ریشه گیاهان مواجه با تنش کلریدسدیم، غلظت پرولین را از طریق افزایش سطح پرولین اکسیداز و کاهش فعالیت گلوتامین‌کیناز، کاهش می‌دهد و به دنبال آن گلوتامین در جهت سنتز کلروفیل مصرف می‌شود (Gobinathan *et al*., 2009).

تنش NaCl، تأثیر معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۱) برفعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز گیاه داشت (جدول ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در سطح ۱۵۰میلی‌مولار NaCl مشاهده شد (جدول ۴). غلظت‌های بالای نمک محرک آسیب اکسیداتیو می‌باشد. گیاهان به منظور مقابله با ترکیبات اکسیدکننده، دارای طیف وسیع و متنوع از آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند سوپراکسیددسموتاز[۱]، کاتالاز[۲]، پلی‌فنل‌اکسیداز[۳] و آسکوربات پراکسیداز[۴] در برابر صدمات اکسیداتیو می‌باشند که از تخریب پروتئین ساختمانی و عملکردی ممانعت به عمل می‌آورند و فعالیت آنزیم‌هایی از قبیل SOD، CAT و APX سبب کاهش میزان H_2O_2 و تبدیل آن به آب شده و منجر به دفع انواع اکسیژن فعال می‌گردد (Gill *et al*., 2015). پلی-فنل‌اکسیداز در فعالیت‌های دفاعی دخالت داشته و واکنش‌های قهوه‌ای‌شدن بافت‌های زخمی و تشکیل سدهای دفاعی در مقابل عوامل بیماری‌زا را هدایت می‌کند. محققان معتقدند میزان فعالیت این آنزیم با افزایش NaCl افزایش می‌یابد که نتیجه آن تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه در مواجهه با تنش است (Pashangeh & Shamili, 2018).

مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که در کلیه سطوح کلریدسدیم، استفاده از تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز را به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد (بدون $CaCl_2$) کاهش داد. بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به‌ترتیب به تیمار کلریدسدیم ۱۵۰میلی‌مولار یون Na^{+} در حضور ۱۵میلی‌مولار یون Ca^{2+} (۰/۰۲۶ A_{430} min^{-1}. g FW) و تیمار شاهد (محیط فاقد یون های Na^{+} و Ca^{2+}) (۰/۰۲۴A_{430} min^{-1}. g FW) مربوط بود (جدول ۴). افزایش غلظت سیتوسولی یون Ca^{2+} به عنوان سیگنال مولکولی، بیان ژن و فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلفی را تنظیم می‌کند. افزایش غلظت کلسیم، بیوسنتر و فعالیت بسیاری از آنزیم‌هایی را که در مقاومت سلول به تنش کلریدسدیم نقش دارند، افزایش و میزان تجزیه پروتئولیتیک را کاهش می‌دهد. کلسیم با تغییر کلی متابولیسم گیاه، تنش اکسیداتیو حاصل از تنش کلریدسدیم را تعدیل می کند (Gill *et al*., 2015).

نتایج نشان داد که کلریدسدیم و کاربرد کلسیم تأثیر معنی‌داری بر محتوای عناصر سدیم، پتاسیم و کلسیم برگ و ریشه گیاه داشتند (جدول ۵). در این آزمایش برهمکنش یون های Na^{+} و Ca^{2+} نیز تأثیر معنی‌داری بر میزان سدیم برگ گیاه داشت (جدول ۵). کاربرد غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار یون Ca^{2+} در تمام سطوح NaCl، موجب کاهش میزان سدیم برگ و ریشه نسبت به شاهد (بدون کاربرد $CaCl_2$) شد. در کلریدسدیم متوسط (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولارNaCl) کاربرد ۱۰میلی‌مولار $CaCl_2$ و در شدت بالای کلریدسدیم (۱۵۰میلی مولار) تنها کاربرد ۵ میلی‌مولار $CaCl_2$، سدیم ریشه و برگ گیاه را به صورت معنی‌داری نسبت به سایر ترکیبات تیماری کاهش داد. به طور کلی تیمار غلظت بالای کلسیم می‌تواند نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به سدیم را کاهش داده و منجر به کاهش سدیم ریشه شود. تیمار کلسیم، موجب جابجایی الکترواستاتیکی سدیم از سطح غشای پلاسمایی به طور مستقیم از کانال‌های مستقل از ولتاژ (VICs)[۵] شد. در پروتوپلاست‌های ریشه، جریان سدیم از طریق VIC به شکل قابل‌توجهی به وسیله کاربرد کلسیم خارجی کاهش یافت و منجر به افزایش غلظت کلسیم و متعاقب آن افزایش غلظت پتاسیم گردید (Taïbi *et al*., 2012).

نتایج نشان داد که غلظت عناصر پتاسیم و کلسیم در ریشه گیاه لوبیا با افزایش کلریدسدیم، به صورت معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۶). باور بر این است که با افزایش غلظت یون سدیم و کاهش پتانسیل آب، تبادل یون و دسترسی ریشه به آن‌ها کاهش معنی‌دار داشته است. غلظت‌های بالای یون Na^{+} نیز میزان کلسیم و پتاسیم برگ را به صورت معنی‌داری کاهش داد که ممکن است علت آن انتقال سدیم از برگ به ریشه باشد، زیرا تحت تنش کلریدسدیم این دو عنصر به عنوان تنظیم کنندگان اسمزی عمل می‌کنن. همچنین کاهش در جذب پتاسیم در محیط شور به علت برهم‌خوردن تعادل هورمونی

۱. SOD
۲. CAT
۳. PPO
۴. APX

۵. Voltage independent channels

گیاه، به‌ویژه سیتوکینین، در ریشه می‌باشد (Ndakidemi & Maki, 2009).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس برای محتوی عناصر سدیم، کلسیم و پتاسیم برگ و ریشه

Table 5. Results of analyze of variance for Ca, Na and K contain of the leaves and roots

منابع تغییرات **Source of varations**	درجه آزادی **df**	سدیم ریشه **Sodium of root**	سدیم برگ **Sodium of leaf**	پتاسیم‌ریشه **Potassium of root**	پتاسیم برگ **Potassium of leaf**	کلسیم‌ریشه **Calcium of root**	کلسیم برگ **Calcium of leaf**
		Mg g^-1^ DW^-1^					
کلریدسدیم NaCl	3	9911.361**	8010.545**	682.362**	747.933**	356.070**	441.111**
کلسیم $CaCl_2$	3	111.442**	260.576**	101.263**	113.569**	48.771**	55.072**
کلریدسدیم و کلسیم NaCl× $CaCl_2$	9	16.178 ns	47.628**	14.888 ns	9.422**	2.979 ns	4.742 ns
Error خطا	32	10.244	5.012	11.006	2.904	4.800	3.533

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

*, **and ns: Significant difference in 0.05, 0.01 and non significant respectively

جدول۶- مقایسه میانگین محتوی عناصر سدیم، کلسیم و پتاسیم برگ و ریشه

Table 6. Mean comparisons for Ca, Na and K contain of the leaves and roots

سطوح کلریدسدیم **NaCl (mM)**	سطوح کلسیم **$CaCl_2$(mM)**	سدیم ریشه **Sodium of root**	سدیم برگ **Sodium of leaf**	پتاسیم‌ریشه **Potassium of root**	پتاسیم برگ **Potassium of leaf**	کلسیم‌ریشه **Calcium of root**	کلسیم برگ **Calcium of leaf**
		Mg g^-1^ DW^-1^					
0	0	16.00 f	8.33 f	37.93 a-c	31.13 b	25.83 c	22.87 c-e
	5	12.67 f	4.33 f	39.33 ab	35.00 ab	27.33 a-c	26.00 bc
	10	13.13 f	5.00 f	40.67 a	36.67 a	28.67 a-c	29.00 ab
	15	12.47 f	6.50 f	38.33 a-c	33.67 ab	30.67 a	31.50 a
50	0	49.67 d	34.67 d	31.17 d-f	21.37 e	22.20 d	19.67 de
	5	45.00 de	24.67 e	35.47 b-d	26.00 cd	27.20 bc	23.00 cd
	10	40.67 e	23.27 e	33.63 cd	27.00 c	28.00 a-c	24.10 c
	15	48.00 d	31.93 d	32.73 de	22.67 de	29.90 ab	23.67 cd
100	0	76.57 a	69.33 a	23.90 gh	17.13 fg	17.67 e-g	15.33 fg
	5	67.33 c	51.00 c	31.83 d-f	23.00 de	19.67 d-f	16.00 fg
	10	71.00 bc	55.00 bc	27.53 fg	20.00 ef	20.67 de	17.00 ef
	15	77.00 a	70.33 a	21.33 hi	14.00 gh	21.60 d	18.67 ef
150	0	78.27 a	58.00 b	20.23 hi	13.97 gh	15.17 g	11.67 h
	5	70.00 bc	54.67 bc	28.00 eg	21.33 e	16.67 fg	13.00 gh
	10	74.20 ab	55.33 bc	23.33 gh	19.00 ef	17.67 e-g	15.33 fg
	15	77.00 a	58.33 b	16.67 i	11.67 h	17.67 e-g	15.00 fg

در هرستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای درصد می‌باشند.

In each column, means with common letter(s) do not have a significant difference at the P<0.05.

در حضور غلظت‌های بالای یون Na^+، معمولاً ترکیبات ROS، پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیداسیون اسیدهای چرب غشایی افزایش می‌یابد که نتیجه آن کاهش پایداری غشاء و تغییر نفوذپذیری آن و نشت الکترولیت‌ها است. ورود سدیم به غشای پلاسمایی سبب دپلاریزاسیون غشاء شده که منجر به بازشدن کانال‌های پتاسیمی یکسو به خارج و نهایتاً سبب کاهش غلظت پتاسیم می‌شوند (Cramer *et al*., 1996).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش یون های Na^+ و Ca^{2+} تنها تأثیر معنی‌داری بر میزان پتاسیم و سدیم برگ گیاه لوبیا داشت (جدول ۵). در تمام سطوح NaCl، کاربرد تیمارهای ۵ و ۱۰میلی‌مولار $CaCl_2$ منجر به افزایش سطح پتاسیم برگ و عمدتاً کاهش سدیم برگ نسبت به شاهد (بدون کاربرد $CaCl_2$) شد (جدول ۶). از آنجا که غلظت سدیم خارجی در محیط‌های دارای کلرید سدیم بیشتر می‌باشد، جذب سدیم به طور قابل‌توجهی بیشتر از پتاسیم است، زیرا افزایش غلظت سدیم سبب اختلال در غشای سلول‌های ریشه و کاهش خاصیت انتخاب‌پذیری غشاء می‌گردد. پتاسیم به عنوان برجسته‌ترین عنصر حل‌شونده به منظور پایین‌نگهداشتن پتانسیل اسمز ریشه و پیش‌نیاز برای تورژسانس سلول‌ها می باشد (Taïbi Kh *et al*., 2012). به همین دلیل در محیط‌های دارای تنش کلریدسدیم، افزایش کلسیم در اطراف سلول، سبب حفظ یکپارچگی و نیمه‌تراوایی می‌شود و در نتیجه نشت مواد

به خارج سلول کاهش می‌یابد (Amirul Alam *et al*., 2015). محققان معتقدند کاربرد خارجی کلسیم از طریق افزایش کلسیم باندشده در غشای پلاسمایی، مانع گسیختگی غشاء شده و در نتیجه سلامتی غشاء و سلول حفظ می‌شود (Hasegava *et al*., 2000).

نتیجه‌گیری

تنش کلریدسدیم (غلظت‌های بالای یون Na^{+}) صفات مورفولوژیکی ریشه و اندام هوایی، شاخص پایداری غشاء، محتوای نسبی آب برگ، کلروفیل‌کل، میزان پتاسیم و کلسیم را به صورت معنی‌داری کاهش و صفاتی مانند مقدار سدیم، پرولین و آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در گیاهچه‌های لوبیاقرمز رقم گلی را افزایش داد. به نظر می‌رسد اختلال در روابط اسمزی، تغذیه‌ای، عدم تعادل هورمونی و تنش اکسیداتیو از جمله مهم‌ترین اثرات ناشی از تنش کلریدسدیم است (Hu *et al*., 2013). کاربرد یون Ca^{2+} و عموماً در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، به مقدار زیادی آسیب‌های ناشی از تنش کلریدسدیم را بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه کاهش داد. تغییر در هدایت هیدرولیکی و روابط آبی گیاه، حفظ انسجام غشاء و محافظت از آن و جذب انتخابی کارآمدتر عناصر غذایی در غشاء از جمله ویژگی‌هایی هستند که تحت تأثیر کاربرد یون Ca^{2+} در گیاهان مواجه با تنش کلریدسدیم بهبود یافتند.

قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت با شمارهٔ کد 3/16268 سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Acosta-Motosa, J.R., Diaz-Vivancosb, P., Álvareza, S., Fernández-Garcíac, N., Sánchez-Blancoa, M.J., and Hernández, J.A. 2015. NaCl-induced physiological and biochemical adaptative mechanisms in the ornamental *Myrtus communis* L. plants. Journal of Plant Physiology 183: 41-51.
2. Al Hassan, M., Morosan, M., Pilar López-Gresa, M., Prohens, J., Vicente, O., and Boscaiu, M. 2016. Salinity-induced variation in biochemical markers provides insight into the mechanisms of salt tolerance in common (*Phaseolus vulgaris*) and Runner (*P. coccineus*) beans. International Journal of Molecular Sciences 17: 3-16.
3. Amira, M.S., and Qados, A. 2011. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 10: 7-15.
4. Amirul Alam, M., Juraimi, A.S., Rafii, M.Y., and Abdul Hamid, A. 2015. Effect of salinity on biomass yield and physiological and stem-root anatomical characteristics of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions. Journal of BioMed Resesrch International 1page.
5. Arnon, D.J. 1956. Chlorophyll absorption spectrum and quantitative determination. Biochimical and Biophysical Acta 20: 449-461.
6. Bates, L.S., Waldren, R.P., and Tear, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. An International Journal on Plant-Soil Relationships 39: 205-207.
7. Bian, Sh., and Jiang, Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Journal of Scientia Horticulturae 120: 246-270.
8. Chapman, H.D., and Pratt, P.F. 1961. Method of Analysis for Soil, Plants and Water. University of California, Division of Agricultural Sciences. Technology & Engineering. 309 pp.
9. Cramer, G.R., and Jones, R.L. 1996. Osmotic stress and abcisic acid reduce cytosolic calcium activities in root of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Cell Environment 19: 1291-1298.
10. Dahal, K., Li, X., Tai, H., Creelman, A., and Bizimungu, B. 2019. Improving potato stress tolerance and tuber yield under a climate change; Scenario A Current Overview. Journal of Frontiers in Plant Science 10: 1-16.
11. Dorri, H.R., 2008. Bean Agronomy. Center of Khomain Bean Research Press.
12. FAO-AQUASTAT & GEMI .2013-2019. Soil Salinity Mitigation and Adaptation Projects. Applications will be accepted from 16th September to 31st May 2019. Area equipped for irrigation and percentage of cultivated land. Available athttp://www.fao.org/nr/water/aquastat/globalmaps/index.stm. Accessed 16 Sep. 2013.
13. Farooq, M., and Barsa, S.M.A. 2010. Changes in nutrient homeostasis and reserves metabolism during rice seed priming: Consequences for seedling emergence and growth. Journal of Agricultiral Sciences China 9: 191-198.

14. Gill, S.S., Anjum, N.A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., and Fujita, M. 2015. Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants (Review Article). Journal of Environmental Science and Pollution Research 22: 10375-10394.
15. Gobinathan, P., Sankar, B., Murali, P.V., and Panneerselvam, R. 2009. Interactive effects of calcium chloride on salinity-induced oxidative stress in *Pennisetum typoidies*. Journal of Botany Research International 2: 143-148.
16. Hadi, M.R., and Karimi, N. 2012. The role of calcium in plants salt tolerance. Journal of Plant Nutrition 35: 2037-2054.
17. Haghighi, M., Afifipour, Z., and Mozafarian, M. 2012. The alleviation effect of silicon on seed germination and seedling growth of tomato under salinity stress. Vegetable Crops Research Bulletin 76: 119-126.
18. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu., J.K., and Bohnert, J.H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 51: 463-499.
19. Hu, T., Yi, H., Hu, L., and Fu, J. 2013. Stomatal and metabolic limitations to photosynthesis resulting from NaCl stress in perennial Ryegrass genotypes differing in salt tolerance. Journal of the American Society for Horticultural Science 138(5): 350-357.
20. Javanshah, A., and Aminian Nasab, S. 2016. The Effects of Humic Acid and Calcium on morpho-physiological traits and mineral nutrient uptake of Pistachio seedling under salinity stress. Journal of Nuts 7(2): 125-135.
21. Koster, P., Wallrad, L., Edel, K.H., Faisal, M., Alatar, A.A., and Kudla, J. 2019. The battle of two ions: Ca^{2+} signalling against Na^{+} stress. Journal of Plant Biology 21: 39-48.
22. Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. Journal of Biological Chemistry 140: 315-322.
23. Ndakidemi, P.A., and Makoi, J.H.J.R. 2009. Effect of NaCl on the productivity of four selected common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Scientific Research and Essay 10: 1066-1072.
24. Neeta Patil, M. 2012. Adaptations in response to salinity in safflower cv. Bhima. Asian Journal of Crop Science 4: 50-62.
25. Niamat, B., Naveed, M., Ahmad, Z., Yaseen, M., Ditta, A., Mustafa, A., Rafique, M., Bibi, R., Sun, N., and Xu, M., 2019. Calcium-enriched animal manure alleviates the adverse effects of salt stress on growth, physiology and nutrients homeostasis of *Zea mays* L. Journal of Plants 8: 1-16.
26. Pashangeh, Z., and Shamili, M. 2018. Ameliorating negative impacts of salinity on physiological characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) by application of gibberellic acid. Journal of Plant Process and Function 7(23) :85-96.
27. Rahman, A., Nahar, K., Hasanuzzaman, M., and Fujita, M. 2016. Calcium supplementation improves NaC/KC ratio, Antioxidant defense and Glyoxalase systems in salt-stressed rice seedlings. Journal of Frontiers in Plant Science 7: 1-38.
28. Raymond, J., Rakariyatham, N., and Azanza. J.L. 1993. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. Journal of Food and Agriculture Organization of the United Nations 34: 927-931.
29. Sairam, R.K., and Saxena, D.C. 2001. Oxidative stress and Antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 184: 55-61.
30. Shabala S. 2013. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. Annals of Botany Journal 112: 1209-1221.
31. Silva Domingues, L., Ribeiro, N.D., Andriolo, J.L., Possobom, M.T.D.F., and Zemolin, A.E.M. 2016. Growth, grain yield and calcium, potassium and magnesium accumulation in common bean plants as related to calcium nutrition. Journal of Acta Scientiarum Agronomy 38: 207-217.
32. Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P., and Mc Manse, M.T. 2010. Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice. African Journal of Biotechnology 9: 145- 152.
33. Taïbi, Kh., Taïbi, F., and Belkhodja, M. 2012. Effect of external calcium supply on the physiological of salt stress seed bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Genetics and Plant Physiology 2: 177-186.
34. Thor, K. 2019. Calcium-nutrient and messenger (moni review). Journal of Frontiers in Plant Science 10: 1-7.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 2, 2020, p. 215-227 (Research Article)

Effects of calcium cholorid on morpho-physiological and biochemical characteristics and some mineral accumulation of Bean *(Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress

Shamsaee[1], F., Ganjeali[2]*, A. & Amjadi[3], E.

1. MSc. of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad; shamsaie@yahoo.com
2. Associate Professor of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences & Department of Legumes, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
3. PhD. Student of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, elham.amjadi@yahoo.com

Received: 14 December 2019
Accepted: 10 May 2020

DOI: 10.22067/ijpr.v11i2.84637

Introduction

In saline environments, plant growth and crop production are greatly reduced. Salinity, induces oxidative stress in the plants resulting in the production of reactive oxygen species (ROS), subsequently, cell membranes, proteins and nucleic acids are destroyed by ROS. Calcium plays a key role in processes that preserve the structural and functional integrity of plant cell membranes, stabilizes cell wall structures, regulates ion transport and selectivity, and controls ion-exchange behavior as well as cell wall enzyme activities. High concentration of Ca^{2+}, stimulates its entry to the cell through ion channels. These channels are also permeable to sodium. Studies have shown that increasing Ca^{2+} concentration, decreases plasma membrane permeability to Na^+ and changes the cell wall properties resulting in reduced Na^+ transport by passive transport and decreased Na^+ accumulation in the cell. The main objective is to identify the interaction effects of Na^+/Ca^{2+} ions on morpho physiological characteristics of Bean plant and investigation the ameliorative effects of Ca^{2+} on salinity-induced damages.

Material and Methods

In order to evaluate the effects of different concentrations of Na^+ (NaCl) including: 0, 50, 100 and 150 mM NaCl and Ca^{2+} ($CaCl_2$) including: 0, 5, 10 and 15 mM $CaCl_2$ on morph physiological characteristics of Bean an experiment was arranged as a factorial, based on completely random design. The plastic pots containing seeds were transferred to growth chamber with 600 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ light intensity, 16/8h light and dark period, respectively. The pots were irrigated with water (without NaCl) for 14 days until emergence, then different concentrations of Ca^{2+} and Na^+ were applied. In 6th week after sowing, plants were harvested and morphological and physiological characteristics were evaluated. The amount of some elements in roots and leaves were determined. Data were analyzed using MSTAT-C software.

Results and Discussion

The interaction of Na^+ and Ca^{2+} on all morphological traits except root dry weight was significant. Toxicity and drought stress are the result of plant exposure to high concentrations of sodium. As water enters the cell, the turgor pressure increases causing the cell walls to extend irreversibly. The rate at which a cell expands is a function of its turgor pressure and cell wall properties. In all salinity levels, the use of 5 and 10 mM Ca^{2+} significantly increased plant height compared to control. In high salinity levels (100 and 150 mM NaCl), the role of calcium in increasing plant height decreased. In severity stress (150 mM NaCl), application of 10 mM Ca^{2+}, significantly increased shoot dry weight and leaf area compared to control. Results for root dry weight showed that, with increasing salinity, root dry weight at all levels of Ca^{2+}, decreased. The highest root dry weight and total root length were attributed to the application of 5 mg Ca^{2+} in saline-free medium. Application of Ca^{2+} (mainly at 5 and 10 mM) moderated the negative effects of salinity on morphological traits. The elevated Ca^{2+} in the medium containing Na^+ ions, inhibits the binding

***Corresponding Author:** ganjeali@um.ac.ir

of Na^{+} to cell walls and the plasma membrane probably. In this way electrolyte leakage in the membrane may be reduced. Calcium improves the ability to synthesize and repair of cell walls with a more efficient function by participating in cell wall construction. In low and medium salinity, the use of 10 mM Ca^{2+} protected cell membranes from adverse effect of Na^{+}, when compared to the control. Supplemental of 5 and 10 mM Ca^{2+} in all salinity levels, almost improved the leaf relative water content when compared to the control (non-applied Ca^{2+}). Promotion in hydraulic conductivity, more stability and efficient membranes for selective absorption are the other features that were affected by Ca^{2+} supplemental. In high salinity, the use of 5 mM Ca^{2+} reduced the negative effects of salinity on total chlorophyll contain when compared to the control. At all salinity levels, application of 5 and 10 mM $CaCl_2$ significantly reduced leaf proline content compared to control. In this regard, the effect of 5 mM Ca^{2+} was greater than 10 mM Ca^{2+}. Addition of Ca^{2+} to the medium of plant exposed to salt stress, reduced proline concentration by increasing proline oxidase and following that reduction in glutamyl kinase activity and finally glutamine is used to synthesize more chlorophyll. At all salinity levels, the use of 5 and 10 mM Ca^{2+} significantly increased the activity of poly phenol oxidase compared to the control. Calcium promoted the synthesis and activity of many enzymes involved in defense mechanism and reduces the rate of proteolytic degradation. In this way Calcium modulates oxidative stress by altering plant metabolism. Results showed that the use of 5 and 10 mM Ca^{2+} significantly ($P \leq 0.05$) reduced the amount of Na^{+} in the plants (leaves + roots) when compared to control. This result for K^{+} accumulation was adverse. The obtained results go in line with the findings of other scientists. Wu and Wang, 2012 reported, Ca^{2+} decreased roots Na^{+} accumulation, increased shoots K^{+} accumulation, and enhanced the selective absorption and transport capacity for K^{+} over Na^{+} in the plant.

Conclusion

Salinity stress significantly reduced plant morphological characteristics but other traits such as proline and polyphenol oxidase increased. Membrane stability index, leaf relative water content, total chlorophyll content and leaf and root potassium content were significantly decreased with applying salinity stress. The use of Ca^{2+} ions, especially 5 and 10 mM, greatly reduced the negative effects of salinity. It seems that the use of calcium application can be considered as a simple and low cost method for reducing the adverse effects of salinity stress.

Keywords: Bean, Membrane stability index, Root and shoot traits, Salinity stress